

► Le développement de la génomique synthétique (GS) a permis l'élaboration d'outils et de méthodes innovantes permettant la synthèse, l'assemblage et la modification génétique précise de chromosomes bactériens complets. La raison principale de ce succès, ayant abouti à la création de la première cellule synthétique quasi-minimale JCVI-syn3.0, est l'utilisation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme hôte temporaire d'accueil et de modification de ces génomes. Cependant, une autre technique a joué un rôle considérable dans le succès retentissant de ces travaux : la transplantation de génomes bactériens (TG). Cette technique, encore mal comprise, permet d'installer des génomes complets naturels ou synthétiques dans un contexte cellulaire favorable à leur expression et donner la vie. Une meilleure compréhension du processus de TG permettrait d'élargir l'ensemble des techniques de GS, appliquées actuellement quasi exclusivement à l'étude des mycoplasmes, à de nombreuses autres bactéries d'intérêt, y compris des bactéries génétiquement non-modifiables à ce jour. ◀

Historique

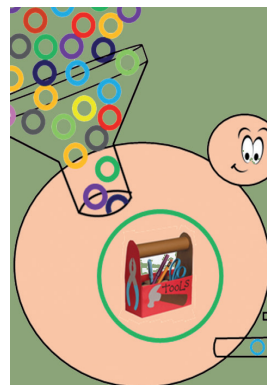
La quête de la cellule minimale : contexte scientifique

Depuis des siècles, la question « Qu'est-ce que la vie ? » est au centre de débats philosophiques et scientifiques pour plusieurs raisons : (1) définir l'essence de la vie, sa signification, sa nature, son origine ; (2) comprendre le fonctionnement d'une cellule vivante ; (3) démontrer l'existence de potentielles formes de vie en dehors de notre planète ; et (4) démontrer la capacité de l'humanité à créer elle-même des entités vivantes, se rapprochant ou pas des cellules naturelles telles que nous les connaissons, pour mieux répondre à certains de nos besoins.

La transplantation de génomes

Redonner vie à des génomes bactériens naturels ou synthétiques

Fabien Labroussaa¹, Vincent Baby²,
Sébastien Rodrigue³, Carole Lartigue²



¹Institute of Veterinary Bacteriology, University of Bern, PO Box, CH-3001 Bern, Suisse.

²UMR 1332 Biologie du fruit et pathologie, INRA Bordeaux-Aquitaine, 71 avenue E. Bourlaux, 33882 Villenave d'Ornon, France.

³Département de biologie, Université de Sherbrooke, 2500 boulevard de l'université, Sherbrooke, Québec, Canada.
carole.lartigue-prat@inra.fr

L'histoire des sciences nous démontre que l'étude de cas extrêmes se révèle souvent très instructive. Il n'est donc pas surprenant de constater qu'il existe un fort intérêt pour l'étude de cellules sous leur forme la plus basique ou « minimale ». En effet, depuis la découverte de l'ADN comme véritable support chimique de l'information génétique [1], la fascination autour de la création d'une cellule possédant le plus petit ensemble de fonctions (et peut-être de gènes) nécessaires et suffisants pour maintenir une forme de vie cellulaire n'a cessé de croître. Deux courants ont émergé : l'approche « constructive » (ou *bottom-up*), visant à construire des systèmes biologiques non naturels en s'appuyant sur l'assemblage de briques élémentaires aux fonctions définies [2-4] (→) et l'approche « réductive » (ou *top-down*), visant à simplifier les systèmes biologiques naturels pour mieux les comprendre et en décrypter tous les mécanismes [5] (→).

Bien qu'il soit possible d'obtenir de telles cellules par réduction artificielle du matériel génétique d'organismes modèles comme *Saccharomyces cerevisiae* (~12 Mpb [mégapaires de bases]), *Escherichia coli* (~4,6 Mpb) ou *Bacillus subtilis* (~4,2 Mpb), une alternative consiste à utiliser des bactéries ayant perdu naturellement une grande partie de leur matériel génétique au cours de l'évolution. C'est le cas des mycoplasmes (bactéries appartenant à la classe des *Mollicutes*) considérés comme les meilleurs représentants de la cellule minimale naturelle et possédant des génomes compris entre 0,58 et 1,35 Mpb. Les travaux initiaux sur ces organismes en tant que modèle minimal ont débuté dans les années 1960, avec un programme financé par la *National aeronautics and space*

(→) Voir la Nouvelle de N. Puff, *m/s* n° 2, février 2012, page 139, et le Dossier technique de V. Noireaux, *m/s* n° 12, décembre 2015, page 1126

(→) Voir la Chronique génomique de B. Jordan, *m/s* n° 6-7, juin-juillet 2016, page 651



administration (NASA) qui visait à rechercher les formes de vie extra-terrestre. Les instigateurs (H. Morowitz et M. Tourtellotte) pensaient que si ces formes existaient, elles devaient être extrêmement simples et s'intéressèrent aux plus petits organismes vivants doués de réplication autonome sur notre planète [4]. Dans les années 1980, H. Morowitz proposa ensuite l'idée de définir en terme moléculaire la machinerie complète d'un mycoplasme en réalisant une carte physique et fonctionnelle du génome [6]. Cette idée ne fut pas suivie immédiatement par la communauté internationale, mais quelques projets indépendants de séquençage à grande échelle débutèrent dans les années qui suivirent [7, 8]. Le laboratoire *Harvard Genome Lab* démarra le séquençage du génome de *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (~1Mpb), et R. Herrmann à l'université d'Heidelberg, celui de *Mycoplasma pneumoniae* (816 kilopaires de bases [kpb]). Cependant, ces génomes ne furent pas les premiers publiés. En 1995, une équipe menée par Craig Venter présentait publiquement la séquence complète du génome de *Mycoplasma genitalium* (580 kpb, 482 gènes) [9], la plus petite bactérie capable de se multiplier en milieu acellulaire et, encore à ce jour, la cellule naturelle représentant le mieux le concept de « cellule minimale ». Mais *M. genitalium* est-elle véritablement une cellule « minimale » ? Est-ce qu'un organisme possédant un génome encore plus petit pourrait vivre et se multiplier dans les meilleures conditions de vie possible, c'est-à-dire en absence de stress et en présence de tous les nutriments nécessaires à sa croissance ? Une cellule minimale ne peut pas, en effet, être dissociée de l'environnement dans lequel elle se trouve et qui permet sa croissance et il est communément accepté que différentes versions de la « cellule minimale » puissent être construites en fonction de l'environnement (ou du milieu de croissance choisi) et du type de cellule étudié [10].

L'avènement de la génomique synthétique

Depuis ces premiers travaux, les méthodes de séquençage de génomes ont connu des progrès fulgurants. Désormais, avec l'émergence de techniques de synthèse d'ADN, nous assistons à l'avènement d'une nouvelle discipline : la « génomique synthétique » [53] (→) permettant, non plus seulement de lire, mais d'écrire (de façon rationnelle), synthétiser et assembler des génomes entiers dans le but de produire des cellules viables aux propriétés biologiques entièrement maîtrisées. Un des premiers défis de la génomique synthétique a été de développer des méthodes de construction de génomes complets afin de produire un microorganisme contrôlé par un génome entièrement synthétique. Ce rêve est devenu réalité en 2010 avec la création de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* JCVI-syn1.0 (*Mmc* JCVI-syn1.0), premier organisme dont le génome a été reconstruit en laboratoire [11]. Cela a été suivi, quelques années plus tard, par la création de *Mmc* JCVI-syn3.0, la première cellule bactérienne « quasi-minimale » contrôlée par un génome synthétique possédant le nombre quasiminimal de gènes nécessaire à la vie en condition contrôlée [12].

Ces deux accomplissements phares de la génomique synthétique marquent le point culminant de plus de vingt ans de recherche. D'un point de vue technique, deux difficultés ont dû être surmontées : (1) l'assemblage, par étapes itératives, de petits fragments d'ADN en fragments de plus en

plus longs [13-16] et (2) « l'activation » des molécules nouvellement générées pour donner la vie. Les étapes initiales de l'assemblage des molécules reposaient sur des réactions réalisées *in vitro* suivies de leur clonage dans la bactérie *Escherichia coli*. Mais face à l'impossibilité de réassembler des fragments supérieurs à 250 kpb chez cette bactérie, une alternative a dû être trouvée. Pour produire le génome JCVI-syn1.0 (~1Mb), un puzzle de 1 078 fragments de 1 080 bases a dû être résolu. L'assemblage de ces éléments s'est finalement fait en utilisant la capacité naturelle de la levure *Saccharomyces cerevisiae* à accepter et à assembler de nombreuses molécules d'ADN étrangères entre elles. « L'activation » des molécules d'ADN nouvellement générées dans la levure a, quant à elle, été réalisée par la technique de « transplantation de génomes ».

Modifications de génomes complets clonés dans la levure *S. cerevisiae*

Les mycoplasmes sont des espèces bactériennes difficilement manipulables sur le plan génétique. Les méthodes de transformation ne sont pas disponibles pour toutes les espèces et les outils génétiques sont peu développés [17]. Lorsque les premiers génomes naturels et synthétiques de mycoplasmes ont été clonés et propagés dans la levure, la palette d'outils génétiques de cette dernière est alors devenue disponible pour modifier les génomes bactériens. Cet hôte d'accueil temporaire est alors apparu comme une plateforme potentielle d'ingénierie génomique (Figure 1).

Le clonage de génomes naturels et synthétiques dans la levure

Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature pour cloner dans la levure des molécules d'ADN de la taille d'un génome. Toutes requièrent (au préalable ou lors de l'entrée de l'ADN dans la levure) l'ajout de séquences qui sont nécessaires au maintien du génome bactérien chez cet hôte [18, 19] : un centromère, un marqueur de sélection et pour les génomes à fort taux en G+C (> 40 %), une ou des origine(s) de réplication de levure (également appelée ARS pour *Autonomously Replicating Sequence*).

À l'heure actuelle, 12 génomes de *Mollicutes*¹, possédant des tailles variables (0,58 à 1,8 Mpb), des taux en G+C compris entre 24 et 40 % et utilisant un code génétique standard ou alternatif, ont été clonés dans la levure (Tableau 1). Le clonage de ces génomes a été réalisé sans difficulté particulière, excepté pour le génome d'*Acholeplasma laidlawii* qui n'a pu être cloné qu'après suppression d'un gène codant une endonucléase [20].

¹ Classe à laquelle appartiennent les mycoplasmes.

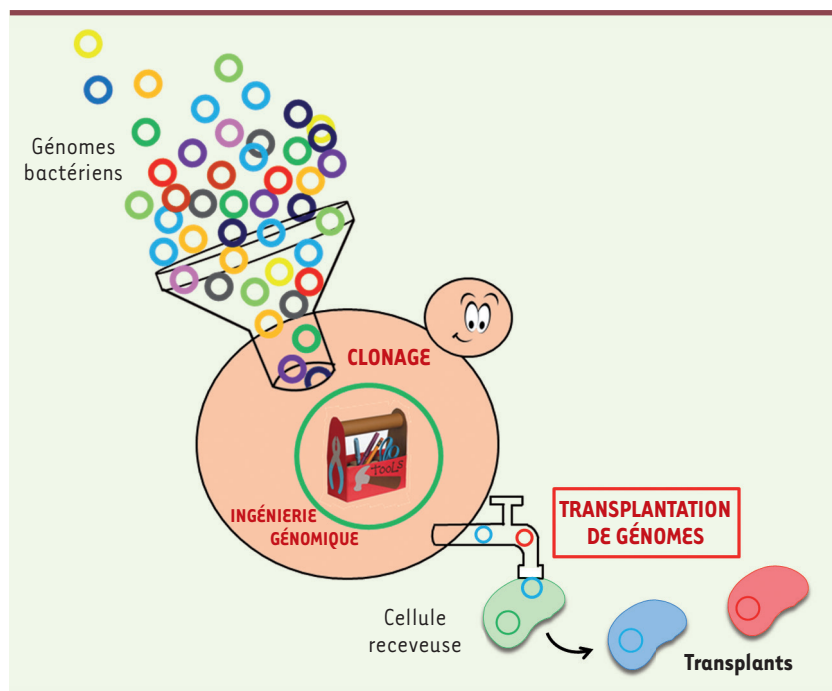


Figure 1. Les techniques de génomique synthétique (GS) utilisent la levure comme hôte intermédiaire pour l'ingénierie génomique précise des génomes bactériens. Le clonage de ces génomes dans la levure ainsi que les techniques d'ingénierie sont universellement applicables à l'ensemble des génomes bactériens. La transplantation de génomes entiers, qui est le sujet de cette revue, représente le goulot d'étranglement pour l'application de l'ensemble des techniques de GS à de nombreuses bactéries non modifiables par les techniques de modification génétique conventionnelles.

En dehors des *Mollicutes*, les génomes naturels de la cyanobactérie *Prochlorococcus marinus* (1,6 Mb et 31 % G+C) [24] et de la protéobactérie *Haemophilus influenzae* (1,8 Mb et 38 % G+C) [54] ont été clonés avec succès dans *S. cerevisiae*, ainsi que les versions synthétiques et réduites des génomes des protéobactéries *Caulobacter crescentus* (0,79 Mb et 57 % G+C) et *E. coli* (1,03 Mb et 51 % G+C) [21, 52] (Tableau 1). Néanmoins, pour ces deux derniers génomes, il a été nécessaire d'introduire une dizaine de séquences ARS pour qu'ils soient maintenus de façon stable dans la levure.

La tentative de clonage du génome naturel de *Synechococcus elongatus* (2,7 Mb et 55 % G+C) a, en revanche, échoué, tout comme celui des génomes à fort pourcentage GC de quelques autres bactéries [23]. Outre les génomes bactériens, de nombreux génomes viraux ainsi que des fragments de chromosomes eucaryotes ont été introduits dans la levure [25, 26].

La modification génétique de génomes bactériens

Les méthodes de génie génétique classiquement utilisées chez la levure ont été revisitées avant d'être appliquées aux génomes bactériens maintenus de façon stable chez cet hôte. Ceci a notamment permis le développement de nouveaux outils génétiques tels que le système TREC (*tandem repeat with endonuclease cleavage*) [27], le TREC-IN [28] ou plus récemment, une méthode fondée sur l'utilisation du système CRISPR/Cas9 [29].

L'utilisation de la levure, comme un atelier d'ingénierie de génomes bactériens s'est révélée extrêmement puissante et a eu un impact indéniable sur l'étude des mycoplasmes. Cependant, la nécessité d'utiliser cet hôte pour l'assemblage des génomes synthétiques a également imposé des contraintes qui auraient pu compromettre les projets visant à construire les cellules « synthétiques » *Mmc* JCVI-syn1.0 et *Mmc* JCVI-syn3.0. En effet, après assemblage dans la levure, les génomes bactériens ne sont ni transcrits, ni traduits par la machinerie eucaryote [30]. De nouvelles techniques ont donc dû être développées pour extraire, manipuler, et transférer des génomes entiers dans un environnement favorable à leur expression. Cette dernière étape fait écho à la technologie de « transplantation de génomes » (TG) qui se définit comme l'installation d'un génome, naturel ou synthétique, dans un cytoplasme receveur de telle façon que le génome donneur devienne le nouveau programme de la cellule (Figures 1 et 2). Véritable figure de proue de la génomique synthétique lors de son élaboration [31], la TG a forcé à elle

seule le choix surprenant et inattendu de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*) comme organisme modèle pour la construction de *Mmc* JCVI-syn1.0. En effet, le génome ultra-minimaliste de *M. genitalium* (0,58 Mpb), initialement anticipé comme support génétique, n'a jamais pu être transplanté dans une cellule receveuse après avoir été pourtant entièrement synthétisé et assemblé dans la levure [32, 33]. Malgré une taille bien supérieure, le génome entier de *Mmc* (1,08 Mpb) fût lui transplanté avec succès. En constituant l'unique porte de sortie pour l'étude des génomes bactériens clonés dans la levure, la TG représente de ce fait le goulot d'étranglement des techniques modernes de génomique synthétique (Figure 1).

La transplantation de génomes bactériens entiers

Le principe de la transplantation de génomes (TG) consiste à immobiliser des génomes bactériens entiers en gel d'agarose afin d'en préserver l'intégrité physique puis de les introduire dans une bactérie receveuse grâce à l'ajout d'un agent fusogène, le polyéthylène glycol (PEG). Le génome donneur devient dès lors le nouveau programme de la cellule qui, en se reproduisant, donne naissance à de

Organismes	Génome (Mbp)	% G+C	Code génétique	Clonage levure	Trans-plantation	Références
MOLLICUTES						
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0,58	32	Non standard	✓	X X	[32]
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0,81	40	Non standard	✓	X X	[19] Lartigue et al., communication personnelle
<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	1,1	24	Non standard	✓	✓ ✓	[18]
<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	1,1	25	Non standard	✓	✓ ✓	[36]
<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>	1,2	24	Non standard	✓	✓ X	[36]
<i>Mycoplasma leachii</i>	1	24	Non standard	✓	✓ ✓	[36]
<i>Mycoplasma putrefasciens</i>	0,8	27	Non standard	✓	✓ ✓	[36]
<i>Mesoplasma florum</i>	0,79	27	Non standard	✓	✓ ✓	[30]
<i>Mycoplasma feriruminatoris</i>	1,2	24	Non standard	✓	✓ ✓	Lartigue et al., communication personnelle
<i>Spiroplasma citri</i>	1,8	26	Non standard	✓	X X	[36]
<i>Mycoplasma hominis</i>	0,66	27	Non standard	✓	X X	[22]
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	1,5	32	Universel	✓	X X	[20]
PROTÉOBACTÉRIES						
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,8	38	Universel	✓	nt nt	[54]
<i>Caulobacter crescentus</i> (<i>C. ethensis</i> -2.0)	0,79	57	Universel	✓	nt nt	[52]
<i>Escherichia coli</i> (génomme réduit)	1,03	51	Universel	✓	X X	[21]
CYANOBACTÉRIES						
<i>Prochlorococcus marinus</i>	1,6	31	Universel	✓	nt nt	[24]
<i>Synechococcus elongatus</i>	2,7	55	Universel	X	nt nt	[23]

Tableau I. Caractéristiques des génomes bactériens clonés dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* et bilan des tentatives (succès ✓ et échecs X) de transplantation de ces derniers dans une cellule receveuse. nt : non tenté.

nouvelles cellules appelées « transplants » présentant un génotype et un phénotype identiques à celui du génome donneur (Figure 2).

Les échecs répétés enregistrés lors des tentatives de TG de *M. genitalium* ont longtemps laissé planer l'incertitude sur la faisabilité d'une telle procédure. En choisissant cette bactérie comme cellule modèle, les chercheurs y avaient vu l'avantage d'un organisme doté d'un génome de très petite taille, plus facile à synthétiser mais n'avaient pas réalisé les difficultés à manipuler cette bactérie en laboratoire. En effet, du fait de leurs génomes réduits, les mycoplasmes, dans leur grande majorité, se caractérisent par une croissance lente et fastidieuse nécessitant un milieu riche [34]. *M. genitalium* en est l'un des exemples les plus flagrants avec un temps de génération supérieur à 8 heures. En se réorientant vers des espèces comme *Mmc* et *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcap*), possédant certes des génomes plus grands, mais ayant un temps de duplication plus court (de l'ordre de 90 min), les chances de réussite se sont grandement améliorées [35]. Les essais de transformations de *Mcap* et *Mmc* avec des petites molécules d'ADN ont mis en évidence la capacité, quasi unique au sein des mycoplasmes, de *Mcap* à pouvoir accueillir et répliquer des plasmides portant les origines de répllication chromosomique (*oriC*) de différents *Mollicutes* (dont certains phylogénétiquement éloignés) [36]. L'utilisation de *Mcap*

comme cellule receveuse pour la TG s'est dès lors imposée d'elle-même.

Les premiers essais visant à transplanter le génome d'une espèce proche d'un point de vue phylogénétique (*Mmc*) dans *Mcap* ont tout d'abord été réalisés avec des génomes directement isolés à partir d'une culture bactérienne pure. Cette transplantation, appelée transplantation « bactérie-bactérie » a permis de donner naissance aux premiers transplants viables [31]. Dans un deuxième temps, le processus a été adapté à la transplantation de génomes bactériens préalablement clonés dans la levure [18]. Cette transplantation « levure-bactérie » nécessite la dégradation de la paroi de la levure par traitement enzymatique (par la zymolyase qui hydrolyse les glucanes de la paroi fongique) permettant de libérer le génome bactérien avant sa transplantation dans la cellule receveuse en suivant un protocole similaire à la transplantation « bactérie-bactérie » [36]. À ce jour, le mécanisme d'entrée du génome donneur dans la cellule receveuse n'est pas clairement compris. Les mycoplasmes ne possédant pas de paroi cellulaire, leur

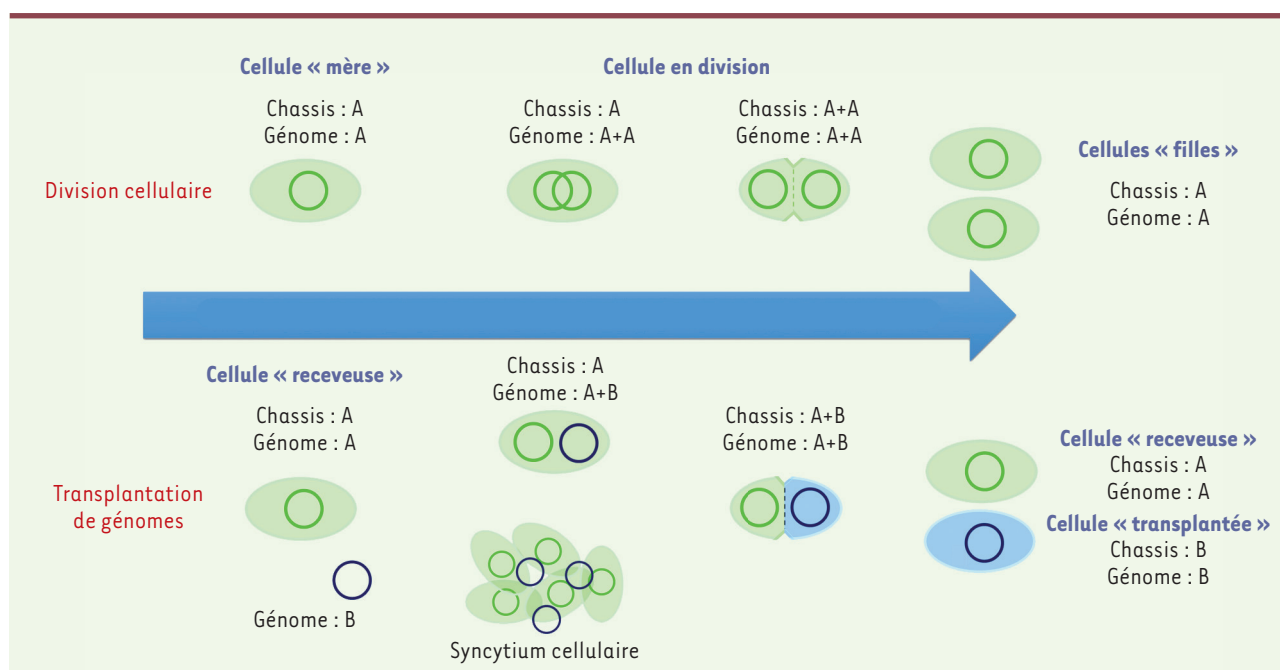


Figure 2. Similitudes et différences entre la division cellulaire et la transplantation de génomes chez les bactéries. Dans les expériences de transplantation de génomes, un marqueur de résistance à un antibiotique est préalablement introduit dans le génome donneur B (en bleu) afin de pouvoir sélectionner les « cellules transplantées » en fin d'expérience. En effet, les cellules hébergeant le génome donneur pourront se multiplier dans un milieu contenant l'antibiotique, alors que les autres seront inhibées ou éliminées.

membrane plasmique est directement en contact avec l'extérieur [37]. La présence de PEG, emprunté aux techniques de transformation de cellules eucaryotes, favorise la fusion des membranes cellulaires. Il est de ce fait probable que l'entrée du génome se fasse soit par invagination de la membrane plasmique, soit par la formation d'un syncytium cellulaire qui pourrait emprisonner l'ADN génomique lors de sa formation (Figure 2).

Bien qu'établie avec succès dès 2007, la TG reste, à plus d'un titre, un mystère. Comment le génome entre-t-il dans la cellule receveuse ? Le génome de la cellule receveuse joue-t-il un rôle dans l'entrée du génome bactérien dans la cellule et, si oui, lequel ? Quel est l'impact de l'absence de paroi cellulaire dans un tel processus ? Plus généralement, quels sont les facteurs qui gouvernent la compatibilité entre le génome entrant et la cellule receveuse ? La réponse à ces questions pourrait certainement permettre d'étendre cette technique à d'autres espèces bactériennes. En effet, en levant le verrou que représente la TG, plusieurs techniques de génomique synthétique seraient applicables à des bactéries pour lesquelles n'existent pas à ce jour d'outils génétiques efficaces (*Chlamydia*, *Brucella*, etc.). En attendant de comprendre ce processus, des facteurs pouvant favoriser ou au contraire gêner la TG ont été identifiés.

Les facteurs influençant la TG

La distance phylogénétique donneur/receveur

Lors de son entrée dans la cellule receveuse, le génome donneur est « nu », c'est-à-dire sans aucune protéine et/ou facteur nécessaire à sa propre expression. La capacité de la machinerie moléculaire de la

cellule receveuse à « prendre en charge » le génome entrant, au minimum lors du premier cycle cellulaire, apparaît donc comme la condition *sine qua non* pour que ce dernier devienne le nouveau programme de la cellule (étape d'initialisation). La cellule receveuse doit être capable de transcrire et traduire les gènes présents dans le génome entrant, jusqu'à ce que ce dernier soit en mesure de le faire et d'assurer la réplication de son génome et la reproduction de la cellule. Les machines moléculaires de la cellule receveuse et le génome donneur doivent donc être compatibles (Figure 3). Dans les travaux princeps, l'utilisation de deux espèces bactériennes phylogénétiquement proches (*Mmc* et *Mcap*) n'a pas été le choix du hasard et a certainement été un facteur clé dans la mise en place du processus. Une étude récente, cherchant à évaluer le degré de compatibilité nécessaire entre la cellule donneuse et le génome donneur a confirmé qu'il existait une corrélation inverse entre la distance phylogénétique et l'efficacité de transplantation [36]. En effet, plus le génome donneur est proche d'un point de vue phylogénétique de celui de la cellule receveuse, plus l'efficacité de transplantation est élevée. Cette corrélation a été retrouvée qu'il s'agisse de transplantations réalisées à partir de génomes isolés de *Mollicutes* ou bien de génomes clonés dans la levure. Une limite de compatibilité semble avoir été atteinte pour la cellule receveuse *Mcap* et se situerait entre les

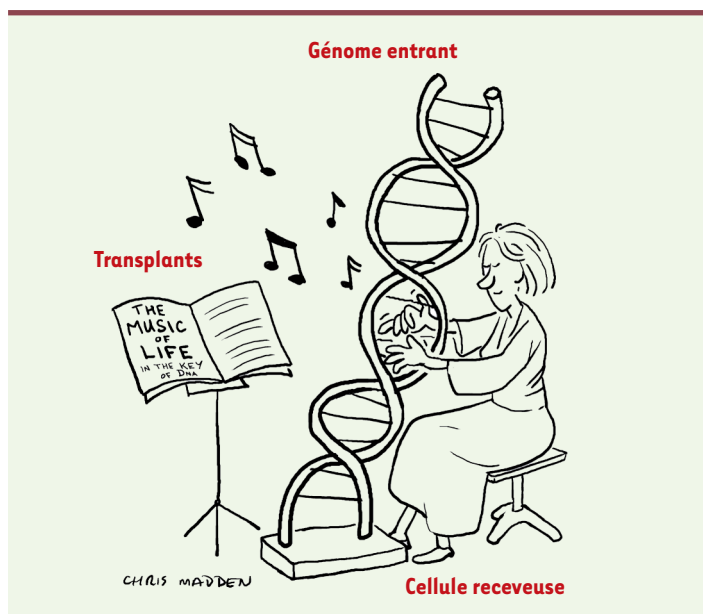


Figure 3. Schéma illustrant la notion de « compatibilité » entre un génome donneur et une cellule receveuse. Après l'entrée d'un génome « donneur » dans une cellule receveuse, la machinerie moléculaire de la cellule receveuse doit être capable de transcrire et traduire les gènes présents sur le génome « donneur » et éventuellement de le répliquer. © Chris Madden.

espèces *Mesoplasma florum* [30] et *Spiroplasma citri* pour laquelle aucun transplant n'a pu être obtenu [36]. Ces résultats indiquent que l'initialisation du génome donneur se fait correctement lorsque le *core-proteome* (protéome conservé) du donneur et de la cellule receveuse possèdent un pourcentage de similarité supérieur à 90 % [36]. Il est fort probable que la conservation et la similitude des protéines impliquées dans la transcription et la traduction soient un facteur décisif.

La réplication et la ségrégation de l'ADN sont également des processus vitaux dans la cellule. Ils assurent que chaque cellule fille, issue de la division cellulaire, hérite d'une copie identique du matériel génétique de la cellule mère. Cependant, ils ne semblent pas pouvoir expliquer, à eux seuls, l'échec de la transplantation entre espèces éloignées. Pour le couple *Mcap/S. citri* par exemple, il a été montré que *Mcap* pouvait répliquer et propager de façon stable un plasmide portant l'origine de réplication chromosomique (*oriC*) de *S. citri*, confirmant que les complexes protéiques d'initiation de la réplication *Mcap* sont recrutés au niveau de l'*oriC* de *S. citri* et que l'amorçage de la réplication se fait correctement. En revanche, tous les essais de TG de *S. citri* dans *Mcap* sont restés vains.

Lors de cette étude, un cas particulier est apparu et vient complexifier cette théorie. Pourtant bien plus proche phylogénétiquement de la cellule receveuse *Mcap* que *M. florum*, la TG de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (*Mmm*) s'est avérée moins efficace dans le cadre d'une transplantation bactérie-bactérie et impossible pour une transplantation levure-bactérie [36]. Ce résultat suggère que de nombreux facteurs, potentiellement intrinsèques à certaines espèces, peuvent interférer avec le processus de TG. L'ensemble de ces facteurs, détaillés ci-dessous, sont résumés dans la Figure 4.

Les facteurs spécifiques d'espèces

Les nucléases

Les nucléases sont des enzymes capables d'hydrolyser les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides adjacents. Certaines bactéries, dont les mycoplasmes, expriment des nucléases de surface liées à la membrane ou excrétées dans le milieu extérieur [38, 39]. Ces enzymes peuvent potentiellement cliver le génome donneur avant même son entrée dans la cellule et doivent donc être neutralisées avant de mettre l'ADN au contact des cellules receveuses (Figure 4A).

Il a été démontré, dans le cadre du clonage du génome d'*Acholeplasma laidlawii* dans la levure, que l'activité de telles nucléases peut aussi avoir des effets particulièrement délétères à d'autres étapes que celle de la TG [20].

Les facteurs du soi et du non-soi

Après son entrée, le génome entrant doit également être « toléré » par la cellule receveuse. Au cours de leur évolution, les bactéries ont développé un ensemble de systèmes leur permettant de faire la distinction entre leur propre ADN (soi) et de l'ADN étranger (non-soi) et ainsi prévenir l'invasion d'agents opportunistes. Les systèmes les mieux caractérisés sont les systèmes de restriction-modification (R-M) [18, 40] et le système de défense adaptatif CRISPR/Cas9 [41, 42], bien que d'autres systèmes aient été décrits récemment [43, 44]. Dans le cadre de la TG, le génome « entrant » peut être considéré comme un ADN étranger par la cellule receveuse. Un système de R-M a été identifié chez *Mcap*, il s'agit d'un système de type II² composé de deux gènes codant des méthyltransférases et d'un gène codant une enzyme de restriction. Les méthyltransférases sont capables de méthyliser l'ADN au niveau des séquences CCATC et l'enzyme de restriction peut cliver l'ADN lorsque ces sites ne sont pas méthylés. L'implication de ce système a été démontrée lors des premiers essais de transplantation du génome de *Mmc* cloné dans la levure, cette dernière ne méthylant que peu ou pas son ADN (Figure 4B). La méthylation *in vitro* du génome de *Mmc* avec des extraits cellulaires de mycoplasmes *Mcap*, ou l'utilisation d'un mutant de *Mcap* n'exprimant plus l'enzyme de restriction, a permis de contourner ce problème [18].

² Système de R-M de type II : la méthyltransférase et l'enzyme de restriction sont produites sous la forme de protéines distinctes n'agissant pas en complexe. Chacune des deux protéines rivalise pour l'accès à un site de reconnaissance commun et unique afin de pouvoir exercer sa fonction. La méthyltransférase (monomère) agit en méthylant ce site un brin à la fois. L'enzyme de restriction (homodimère), clive l'ADN à une position définie proche de la séquence de reconnaissance ou bien à l'intérieur de celle-ci.

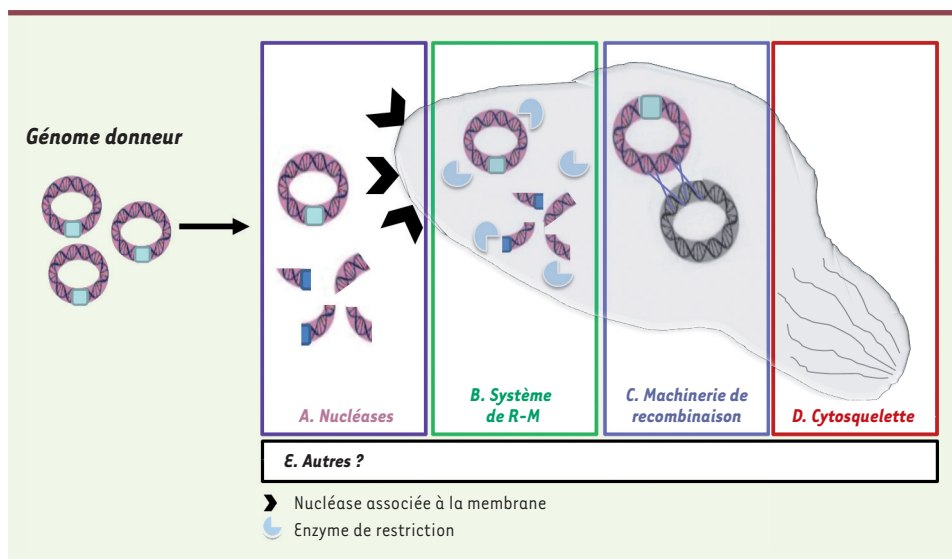


Figure 4. Obstacles potentiels à la transplantation du génome chez les bactéries. **A.** Des nucléases non spécifiques (sécrétées dans l'environnement ou liées à la membrane) peuvent hydrolyser l'ADN avant son entrée dans la cellule et doivent donc être inactivées. **B.** Les systèmes de restriction-modification (R-M), mécanisme de défense contre l'invasion d'ADN étranger, hydrolysent l'ADN entrant incorrectement méthylé. **C.** La machinerie de réparation/recombinaison de l'ADN de la cellule receveuse peut induire des événements de recombinaison

homologues ou illégitimes entre génome donneur et génome de la cellule receveuse, pouvant aboutir à des cellules abritant des génomes mosaïques ou hybrides. **D.** Certaines bactéries possèdent sous la membrane plasmique un réseau structuré de filaments formant le cytosquelette pouvant « physiquement » empêcher l'entrée du génome donneur. **E.** Les systèmes toxine/antitoxine, les systèmes de reconnaissance d'ADN étranger (CRISPR, etc.) ou encore les séquences d'insertion (IS) pourraient également limiter la compatibilité entre le génome donneur et celui de la cellule receveuse.

Le système toxine-antitoxine

Certaines bactéries produisent des systèmes toxine-antitoxine (TA) [45]. Ces systèmes sont des modules génétiques composés d'une toxine (ARNm ou protéine) et d'une antitoxine protéique antagoniste inhibant la fonction toxique. Cette dernière est généralement moins stable que la toxine et se dégrade rapidement sous l'effet de différents stress cellulaires [45]. Il semble que certains génomes de mycoplasmes possèdent au moins un système de ce type (F Labroussaa, communication personnelle). Dans le cas où le génome entrant et celui de la cellule receveuse ne possèdent pas le même système toxine-antitoxine, il est possible qu'une toxine produite par le génome de la cellule receveuse persiste plus longtemps que sa partenaire dans le cytoplasme et provoque la mort cellulaire des transplants.

La recombinaison homologue

Lors de l'entrée du génome donneur dans la cellule receveuse, les deux génomes (à minima) (voir la formation de syncytium, Figure 2) peuvent potentiellement interagir et des événements de recombinaison homologues ou illégitimes sont dès lors possibles (Figure 4C). De tels événements pourraient aboutir à des cellules abritant des génomes mosaïques ou hybrides et non à des cellules dont le génome endogène a été entièrement remplacé par le génome exogène. Des génomes mosaïques ont été observés chez *Mycoplasma agalactiae* à la suite d'événements de conjugaison d'éléments intégratifs et conjuguatifs [46], démontrant la réelle possibilité que ces événements puissent se produire lors d'expériences de TG. Néanmoins, ce phénomène n'a, à ce jour, jamais été mis en évidence lors de ces expériences.

L'absence de système de recombinaison homologue efficace chez les mycoplasmes a certainement été un autre facteur facilitant le

développement du protocole de TG. Cependant, chez des bactéries possédant des systèmes de recombinaison actifs, ce phénomène pourrait jouer un rôle important.

Cytosquelette

Contrairement aux mycoplasmes du groupe phylogénétique *Mycoides* auquel appartiennent *Mcap* et *Mmc*, *M. genitalium* et *M. pneumoniae* présentent une structure polaire multifonctionnelle (ou tip), essentielle à la colonisation de l'hôte, à la motilité et à la division cellulaire [47]. Cette dernière est associée à un cytosquelette interne dense (Figure 4D), indispensable à son assemblage et à sa fonction. Les échecs récurrents de TG observés chez ces espèces pourraient être liés à la présence de ces édifices moléculaires qui constitueraient une sorte de barrière « physique » et s'opposeraient à l'entrée de grandes molécules d'ADN.

Les échecs rencontrés lors des expériences de TG entre *Mcap* et *S. citri*, pourraient également être en lien avec le cytosquelette, mais de façon différente. *S. citri* possède naturellement une forme spiralée due à la présence d'un cytosquelette interne unique chez les mycoplasmes, et éventuellement difficile à reformer dans la cellule receveuse *Mcap*.

Les éléments mobiles

Certaines pistes de recherche désignent les séquences d'insertions (IS) présentes en très grand nombre dans le

génomique de *Mmm* (environ 13 % du génome) comme barrières possibles à la TG. L'absence de régulation des éléments des IS chez *Mcap* (dont le génome est naturellement dépourvu de ces séquences), pourrait provoquer des événements de transpositions incontrôlés et l'insertion anarchique de ces séquences au niveau de gènes essentiels. L'étude de la régulation de ces IS chez les mycoplasmes est actuellement en cours. La mise au point d'un processus de transplantation intra-espèce, utilisant *Mmm* comme cellule receveuse, pourrait limiter l'impact de ce phénomène, mais sa mise en place s'avère fastidieuse.

La transplantation de génomes, plus qu'une technique

La TG peut être vue comme un nouveau mode de transfert d'ADN chez les bactéries. Cependant, contrairement à des mécanismes bien connus comme la transformation bactérienne, la conjugaison et la transduction, la TG reste pour l'instant limitée au laboratoire. De plus, mettant en jeu de l'ADN « déprotéinisé », il est peu probable que ce phénomène ait lieu en condition naturelle.

D'un point de vue plus conceptuel, la TG paraît être bien plus qu'une simple technique de laboratoire. Elle rejoint les préceptes issus des expériences de Griffith [1] et d'Avery, McLeod et McCarty [48], en démontrant que l'ADN est le véritable support de l'information génétique. En effet, en changeant complètement le programme génétique d'une cellule, sa « fiche d'identité » ou son phénotype (*Mcap* vs *Mmc*) change également radicalement. En revanche, la TG ne représente pas la création de la vie *stricto sensu*, comme il a souvent été évoqué. À l'instar de la division cellulaire, elle garantit la continuité de la vie par le biais de la propagation d'une série de fonctions de base et communes à toutes les cellules et conservées quelle que soit leur « fiche d'identité », assurant ainsi l'ensemble des activités nécessaires à la réplication du génome et à la reproduction de la cellule (Figure 2). Néanmoins, et contrairement à la division cellulaire qui donne naissance à deux cellules filles génotypiquement et phénotypiquement identiques, la TG donne naissance à une cellule fille dont le génome peut être différent de celui d'autres espèces bactériennes naturelles (Figure 2). Par conséquent, elle permet la construction de nouvelles formes de vie qui ne sont pas directement le fruit de l'évolution, rejoignant ainsi parfaitement la définition communément admise de la génomique synthétique.

Intérêt de la TG et perspectives

Le domaine de la génomique synthétique a pris de l'ampleur ces dernières années, à la fois au travers d'aboutissements importants, comme la création des premières cellules contrôlées par des génomes synthétiques, mais aussi en stimulant le développement d'outils et de méthodologies innovantes (synthèse de génomes complets, clonage, manipulation et transplantation de génomes entiers). En combinant ces nouvelles approches de génomique synthétique à des approches bio-informatiques, l'exploration des fonctions essentielles à la vie d'une cellule minimale change désormais d'échelle. En dehors des réponses aux questions sur le fonctionnement du vivant, ces technologies peuvent également offrir de nombreuses applications, notamment dans les domaines de la biotechno-

logie (reprogrammation métabolique de bactéries) et/ou de la vaccinologie. En effet, l'un des principaux problèmes rencontrés pour l'étude de nombreux agents pathogènes, est l'inefficacité, voire le manque total pour certains patho-systèmes, d'outils moléculaires nécessaires à l'étude fonctionnelle de leurs gènes. Ceci rend extrêmement complexe la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathogénicité de ces microorganismes et, de ce fait, la mise en place de méthodes prophylactiques et/ou l'établissement de traitements durables et efficaces. Un des objectifs principaux de la génomique synthétique sera certainement d'adapter les technologies existantes à de nouvelles espèces bactériennes, génétiquement non modifiables à l'heure actuelle, afin de mettre en place des « plateformes d'ingénierie génomique » qui puissent être utilisées ultérieurement pour la recherche fondamentale et appliquée.

En ce qui concerne les *Mollicutes*, les récentes publications portant sur la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathogénicité des mycoplasmes [49-51] démontrent déjà l'apport indéniable des techniques de génomique synthétique. Néanmoins, elles sont encore restreintes à un trop petit nombre d'espèces bactériennes et de laboratoires, principalement à cause de la TG. À notre connaissance, les techniques de génomique synthétique appliquées aux mycoplasmes sont, à l'heure actuelle, maîtrisées par quatre laboratoires à travers le monde (JCVI à Rockville, États-Unis ; l'INRA à Bordeaux ; l'université de Sherbrooke à Québec, Canada ; et l'Institut de bactériologie vétérinaire – IVB – à Berne, Suisse). Les techniques de synthèse et de réassemblage de génomes entiers dans la levure commencent, quant à elles, à être appliquées à d'autres espèces bactériennes ; la création du premier génome entièrement synthétique de *Caulobacter ethensis-2.0* est le dernier exemple en date [52]. En revanche, aucune méthode de TG n'a pour l'instant abouti en dehors des *Mollicutes*. La recherche de nouvelles cellules receveuses, phylogénétiquement proches du génome donneur d'intérêt, permettrait certainement de s'affranchir de l'incompatibilité des machineries cellulaires donneur/receveur au cours de la TG. Cependant, cette approche nécessite de mettre au point de nouveaux protocoles de transplantation pour chaque espèce considérée, et cela peut se révéler extrêmement fastidieux. Concernant les *Mollicutes*, la production d'une cellule receveuse « optimisée », fondée sur le génome de *Mcap* génétiquement modifiée, est une autre piste de recherche intéressante. En effet, l'introduction dans le génome de la cellule receveuse de gènes impliqués dans les principales fonctions cellulaires du génome donneur (transcription, traduction, réplication) ou dans la régulation de certaines barrières à la

transplantation précédemment identifiées (RM, IS, etc.), pourrait permettre d'améliorer le degré de compatibilité et l'installation de génomes de mycoplasmes non « transplantables » à ce jour. ♦

SUMMARY

Whole genome transplantation: bringing natural or synthetic bacterial genomes back to life

The development of synthetic genomics (SG) allowed the emergence of several groundbreaking techniques including the synthesis, assembly and engineering of whole bacterial genomes. The successful implantation of those methods, which culminated in the creation of JCVI-syn3.0 the first nearly minimal bacterium with a synthetic genome, mainly results from the use of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a transient host for bacterial genome replication and modification. Another method played a key role in the resounding success of this project: bacterial genome transplantation (GT). GT consists in the transfer of bacterial genomes cloned in yeast, back into a cellular environment suitable for the expression of their genetic content. While successful using many mycoplasma species, a complete understanding of the factors governing GT will most certainly help unleash the power of the entire SG pipeline to other genetically intractable bacteria. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

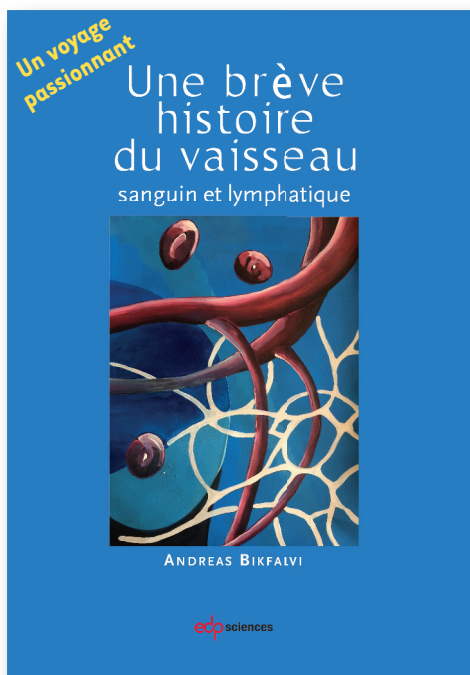
RÉFÉRENCES

- Griffith F. The significance of pneumococcal types. *J Hyg (Lond)* 1928 ; 27 : 113-59.
- Puff N. Un modèle avancé de cellule synthétique minimale. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 139-41.
- Noireaux V. Construction de cellules synthétiques. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 1126-32.
- Morowitz HJ, Tourtellotte ME. The smallest living cells. *Sci Am* 1962 ; 206 : 117-26.
- Jordan B. Synthétique, vous avez dit « Synthétique » ? *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 651-3.
- Morowitz HJ. The completeness of molecular biology. *Isr J Med Sci* 1984 ; 20 : 750-3.
- Bork P, Ouzounis C, Casari G, et al. Exploring the *Mycoplasma capricolum* genome: a minimal cell reveals its physiology. *Mol Microbiol* 1995 ; 16 : 955-67.
- Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, et al. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 1996 ; 24 : 4420.
- Fraser CM, Gocayne JD, White O, et al. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 1995 ; 270 : 397-403.
- Porcar M, Danchin A, de Lorenzo V, et al. The ten grand challenges of synthetic life. *Syst Synth Biol* 2011 ; 5 : 1-9.
- Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 2010 ; 329 : 52-6.
- Hutchison CA, Chuang RY, Noskov VN, et al. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science* 2016 ; 351 : aad6253.
- Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 2009 ; 6 : 343-5.
- Gibson DG, Smith HO, Hutchison CA, et al. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nat Methods* 2010 ; 7 : 901-3.
- Itaya M, Fujita K, Kuroki A, Tsuge K. Bottom-up genome assembly using the *Bacillus subtilis* genome vector. *Nat Methods* 2008 ; 5 : 41-3.
- Itaya M, Tsuge K, Koizumi M, Fujita K. Combining two genomes in one cell: stable cloning of the *Synechocystis* PCC6803 genome in the *Bacillus subtilis* 168 genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 15971-6.
- Halbedel S, Stülke J. Tools for the genetic analysis of *Mycoplasma*. *Int J Med Microbiol* 2007 ; 297 : 37-44.
- Lartigue C, Vashee S, Algire MA, et al. Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. *Science* 2009 ; 325 : 1693-6.
- Benders GA, Noskov VN, Denisova EA, et al. Cloning whole bacterial genomes in yeast. *Nucleic Acids Res* 2010 ; 38 : 2558-69.
- Karas BJ, Tagwerker C, Yonemoto IT, et al. Cloning the *Acholeplasma laidlawii* PG-8A genome in *Saccharomyces cerevisiae* as a yeast centromeric plasmid. *ACS Synth Biol* 2012 ; 1 : 22-8.
- Zhou J, Wu R, Xue X, Qin Z. CasHRA (Cas9-facilitated Homologous Recombination Assembly) method of constructing megabase-sized DNA. *Nucleic Acids Res* 2016 ; 44 : e124.
- Rideau F, Le Roy C, Descamps ECT, et al. Cloning, stability, and modification of *Mycoplasma hominis* genome in yeast. *ACS Synth Biol* 2017 ; 6 : 891-901.
- Noskov VN, Karas BJ, Young L, et al. Assembly of large, high G+C Bacterial DNA fragments in yeast. *ACS Synth Biol* 2012 ; 1 : 267-73.
- Tagwerker C, Dupont CL, Karas BJ, et al. Sequence analysis of a complete 1.66 Mb *Prochlorococcus marinus* MED4 genome cloned in yeast. *Nucleic Acids Res* 2012 ; 40 : 10375-83.
- Vashee S, Stockwell TB, Alperovich N, et al. Cloning, assembly, and modification of the primary human cytomegalovirus isolate toledo by yeast-based transformation-associated recombination. *mSphere* 2017 ; 2(5) : e00331-17.
- Oldfield LM, Grzesik P, Voorhies AA, et al. Genome-wide engineering of an infectious clone of herpes simplex virus type 1 using synthetic genomics assembly methods. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017 ; 114 : E8885-94.
- Noskov VN, Segall-Shapiro TH, Chuang R-Y. Tandem repeat coupled with endonuclease cleavage (TREC): a seamless modification tool for genome engineering in yeast. *Nucleic Acids Res* 2010 ; 38 : 2570-6.
- Chandran S, Noskov VN, Segall-Shapiro TH, et al. TREC-IN: gene knock-in genetic tool for genomes cloned in yeast. *BMC Genomics* 2014 ; 15 : 1180.
- Tsarnopoulou I, Gourgues G, Blanchard A, et al. In-yeast engineering of a bacterial genome using CRISPR/Cas9. *ACS Synth Biol* 2016 ; 5 : 104-9.
- Baby V, Labrousseau F, Brodeur J, et al. Cloning and transplantation of the *Mesoplasma florum* genome. *ACS Synth Biol* 2018 ; 7 : 209-17.
- Lartigue C, Glass JI, Alperovich N, et al. Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* 2007 ; 317 : 632-8.
- Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkuch C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science* 2008 ; 319 : 1215-20.
- Gibson DG, Benders GA, Axelrod KC, et al. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 20404-9.
- Tully JG, Whitcomb RF, Clark HF, Williamson DL. Pathogenic mycoplasmas: cultivation and vertebrate pathogenicity of a new spiroplasma. *Science* 1977 ; 195 : 892-4.
- Lartigue C, Blanchard A, Renaudin J, et al. Host specificity of mollicutes oriC plasmids: functional analysis of replication origin. *Nucleic Acids Res* 2003 ; 31 : 6610-8.
- Labrousseau F, Lebaudy A, Baby V, et al. Impact of donor-recipient phylogenetic distance on bacterial genome transplantation. *Nucleic Acids Res* 2016 ; 44 : 8501-11.
- Chambaud I, Wróblewski H, Blanchard A. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends Microbiol* 1999 ; 7 : 493-9.
- Sharma S, Tivendale KA, Markham PF, Browning GF. Disruption of the membrane nuclease gene (MBOVP45_0215) of *Mycoplasma bovis* greatly reduces cellular nuclease activity. *J Bacteriol* 2015 ; 197 : 1549-58.
- Jarvill-Taylor KJ, VanDyk C, Minion FC. Cloning of mnuA, a membrane nuclease gene of *Mycoplasma pulmonis*, and analysis of its expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1999 ; 181 : 1853-60.
- Algire MA, Montague MG, Vashee S, et al. A Type III restriction-modification system in *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Open Biol* 2012 ; 2 : 120115.
- Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 2010 ; 327 : 167-70.
- Vasu K, Nagaraja V. Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 2013 ; 77 : 53.
- Goldfarb T, Sberro H, Weinstock E, et al. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO J* 2015 ; 34 : 169-83.
- Ofir G, Melamed S, Sberro H, et al. DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nat Microbiol* 2018 ; 3 : 90-8.
- Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biol Direct* 2009 ; 4 : 19.
- Faucher M, Nouvel L-X, Dordet-Frisoni E, et al. Mycoplasmas under experimental antimicrobial selection: The unpredicted contribution of horizontal chromosomal transfer. *PLoS Genet* 2019 ; 15 : e1007910.

RÉFÉRENCES

47. Waites KB, Xiao L, Liu Y, et al. *Mycoplasma pneumoniae* from the respiratory tract and beyond. *Clin Microbiol Rev* 2017 ; 30 : 747-809.
48. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med* 1944 ; 79 : 137-58.
49. Schieck E, Lartigue C, Frey J, et al. Galactofuranose in *Mycoplasma mycoides* is important for membrane integrity and conceals adhesins but does not contribute to serum resistance. *Mol Microbiol* 2016 ; 99 : 55-70.
50. Jores J, Ma L, Ssajjakambwe P, Schieck E, et al. Removal of a subset of non-essential genes fully attenuates a highly virulent *Mycoplasma* strain. *Front Microbiol* 2019 ; 10 : 664.
51. Jores J, Schieck E, Liljander A, et al. *In vivo* role of capsular polysaccharide in *Mycoplasma mycoides*. *J Infect Dis* ; 219 : 1559-63.
52. Venetz JE, Del Medico L, Wölfle A, et al. Chemical synthesis rewriting of a bacterial genome to achieve design flexibility and biological functionality. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019 ; 116 : 8070-9.
53. Baby V, Labrousse F, Lartigue C, Rodrigue S. Chromosomes synthétiques : réécrire le code de la vie. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 753-60.
54. Karas BJ, Jablanovic J, Sun L, et al. Direct transfer of whole genomes from bacteria to yeast. *Nat Methods* 2013 ; 10 : 410-2.

TIRÉS À PART
C. Lartigue



ISBN : 978-2-7598-1863-1

202 pages

25 €

Ce livre, intéressant et lisible à la fois pour le spécialiste et le grand public, apporte des observations originales et nouvelles concernant l'angiogenèse, et notamment l'histoire des différentes découvertes, et discute les aspects et les concepts plus généraux en les plaçant dans le contexte de la philosophie des sciences.

Facile à lire, bien illustré, cet ouvrage cherche à comprendre et à faire comprendre les enjeux de la recherche sur l'arbre vasculaire en développement et en pathologie. Il intéressera non seulement les étudiants et post-doctorants en biologie, mais aussi les chercheurs actifs dans ce domaine de recherche ainsi que toute personne intéressée par la biologie et la médecine et par l'histoire des sciences. Un voyage passionnant à travers l'histoire et les concepts les plus actuels concernant les recherches sur le vaisseau sanguin.

Andreas Bikfalvi est Professeur à l'université de Bordeaux et Directeur d'une unité de recherche Inserm sur le cancer et la biologie vasculaire. Il est, par ailleurs, membre senior de l'Institut Universitaire de France (IUF) et reconnu internationalement pour ses recherches dans le domaine de l'angiogenèse tumorale.

BON DE COMMANDE

À retourner à EDP Sciences, 17, avenue du Hoggar, 91944 Les Ulis Cedex, France
Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : françois.flori@edpsciences.org

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir

Une brève histoire de vaisseau : 25 € + 3 € de port = 28 € TTC

en exemplaire, soit un total de €

☐ Par chèque, à l'ordre de EDP Sciences

☐ Par carte bancaire : ☐ Visa ☐ Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | |

Date d'expiration : | | | | | | N° de contrôle au dos de la carte : | | | | | | Signature :